

DEUTSCHES PATENTAMT



SCIENTIFIC LIBRARY

OCT 28 1956

U. S. PATENT OFFICE

BEST AVAILABLE COPY

BESTAUSLEGESCHRIFT 1 063 330

R 19912 VIII d/30d

ANMELDETAG: 30. OKTOBER 1956

BEKANNTMACHUNG
DER ANMELDUNG
UND AUSGABE DER
AUSLEGESCHRIFT:

13. AUGUST 1959

1

Es wurden schon verschiedene Transplantationsmittel für Säugetiere vorgeschlagen; es fehlt aber ein röhrenförmiges Material, vor allem in Y- oder T-Form, das leicht erhältlich ist, präserviert und aufbewahrt werden kann und für den Träger verträglich ist, d. h. nicht zu Trombosen, Arterienerweiterung oder einem Reißen der Plastik führt. 5

Die Erfindung betrifft nun ein röhrenförmiges, in trockener Form oder in einer sterilen Flüssigkeit aufzubewahrendes, bei 240 mm Quecksilbersäule Luftinnendruck undurchlässiges, steriles, zum Einsetzen in Menschen oder Säugetiere geeignetes Kollagenmaterial, vorzugsweise in Y- oder T-Form, das einen Kollagengehalt von mindestens 80% aufweist und in dem die Kollagenfasern praktisch ihre natürliche Zusammensetzung aufweisen. 15

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zum Herstellen des röhrenförmigen Kollagenmaterials, insbesondere bei dem röhrenförmige Blutgefäße von Säugetieren, vorzugsweise von Rindern, mit einer 20 0,25- bis 5%igen Ficin-Enzymlösung bei Temperaturen von 30 bis 45°C in einem pH-Bereich der Lösung von 4,0 bis 7,0 während einer Zeit von 2 bis 8 Stunden bis zum Ansteigen des Kollagengehalts auf mindestens 80% abgebaut werden, worauf das behandelte Material zur Entfernung des Enzyms mit Wasser gewaschen und anschließend einer Härtungsbehandlung unterworfen wird. 25

Ficin ist ein proteolytisches kristallisiertes Enzym, gewonnen aus dem Milchsaft des Feigenbaumes (vergleiche z. B. Hackhs »Chemical Dictionary«, 3. Auflage, McGraw-Hill Book Company Inc., New York, N. Y., S. 339). 30

Wird die Härtung mit wäßrigem Formaldehyd durchgeführt, so sind Konzentrationen des Formaldehyds in Wasser von 0,3 bis 3,3%, Temperaturen zwischen 10 und 35°C und eine Behandlungsdauer von 4 bis 24 Stunden geeignet. Weitere Härtungsmittel sind beispielsweise Chromoxyd oder Methanol. Anschließend an die Härtungsbehandlung wird das Material beispielsweise mit Äthylen- oder Propylenoxyd sterilisiert. Das gewaschene gehärtete Produkt kann in einer Flüssigkeit, wie 50%igem Äthylalkohol oder Isopropylalkohol, die gegebenenfalls sterilisierende Substanzen, z. B. 1% Propylenoxyd, enthalten, aufbewahrt oder auch anschließend einer Gefriertrocknung unterworfen werden. 40

Beispiel 1

3 g (Naßgewicht) frische Rinder-Kopfschlagader, die von fremdem oder Lympghewebe frei ist, wird mit 20 g einer wäßrigen Lösung von 1%igem handelsüblichem Ficin, das Spuren (z. B. 0,00005 bis 0,005 Gewichtsprozent) von NatriumRECEIVED TIME NOV. 20.

Stoffe für Fremdtransplantationen**Anmelder:**

Dr. med. Norman Rosenberg,
Highland Park, N. J.,
und Eugene Robert Lawrence Gaughran,
New Brunswick, N. J. (V. St. A.)

Vertreter:

Dr.-Ing. A. v. Kreisler, Dr.-Ing. K. Schönwald,
Dipl.-Chem. Dr. phil. H. Siebeneicher
und Dr.-Ing. Th. Meyer, Patentanwälte,
Köln 1, Deichmannhaus

Beanspruchte Priorität:
V. St. v. Amerika vom 1. November 1955

Dr. med. Norman Rosenberg, Highland Park, N. J.,
und Eugene Robert Lawrence Gaughran,
New Brunswick, N. J. (V. St. A.),
sind als Erfinder genannt worden

2

35 beschleuniger und den Standard-Phosphat-Citrat-Puffer des pH-Wertes von 5 enthält (Handbook of Chemistry and Physics, Chemical Rubber Publishing Co., 30. Ausgabe, 1947, S. 1405; McIlvaine Standard Puffer), bei einer Temperatur von 37°C während einer Zeit von 3 Stunden behandelt.

Danach wird das Material mechanisch von losem Gewebe gereinigt, mit fließendem Wasser so lange gewaschen, bis die Waschlösung klar ist, anschließend bei 25°C 18 Stunden in eine 0,33%ige wäßrige Formaldehydlösung eingetaucht und etwa 15 Stunden in langsam fließendem Wasser gewaschen. 45

Das erhaltene Material wird auf Festigkeit und Dichtigkeit geprüft, beispielsweise indem ein Ende der Röhre mit einem Drucklufthahn verbunden wird, während alle anderen Öffnungen zugebunden werden, das Ganze in Wasser getaucht und der Luftdruck erhöht wird. Eine Röhre wird als befriedigend angesehen, wenn sie sich bei einem Aufdruck von weniger als 100 mm Hg nicht umgedreht. RECEIVED TIME NOV. 20. 6:27 AM PRINT TIME NOV. 20. 6:27 AM

3

Luft durchläßt. Derartige Röhren können in 50%igem wäßrigem Äthylalkohol aufgehoben werden. Zum längeren Lagern kann das Fertigprodukt in einer Sterilisierungslösung auf 1% Propylenoxyd in 50%igem wäßrigem Äthylalkohol aufbewahrt werden.

Es werden 7 μ dicke Gewebequerschnitte auf die übliche Weise durch Einbetten in Paraffin hergestellt. Die eine Probe wird mit Standard Hämatoxylin und Eosin, die andere mit Verhöftischer Bindegewebefarbe angefärbt (»Biological Staining Methods«, 5. Ausgabe, 1952, George T. Gurr Ltd., London) und die erhaltenen Präparate mikroskopisch untersucht.

Die Proben bestehen aus einer dichten äußeren Schicht aus groben Kollagenbündeln, die mit Fuchsin stark gefärbt sind, und aus einer inneren Schicht 15 dünner, geschichteter Kollagenringe. Diese können geringe oder nicht störende Mengen unvollständig abgebauten Muskelgewebes enthalten.

Bei oberflächlicher Betrachtung ist das Produkt weiß, die äußere Oberfläche gibt den Eindruck von spiralen Vernetzungen grober Faserbündel, die innere Oberfläche ist glatt und glitzert.

Wahlweise kann die Röhre nach der Behandlung mit Enzymlösung auch durch Behandeln mit einem Chromoxydbad während 45 Minuten bei Raumtemperatur gehärtet und anschließend 1 Stunde in fließendem Leitungswasser gewaschen werden. Die Gelösung kann folgendermaßen hergestellt werden: eine Mischung aus 103 g Ammoniumbichromat und 178 g konzentrierter Schwefelsäure (etwa 96%) wird mit Wasser zu 1 l verdünnt, und 24 Gewichtsprozent wäßriges Natriumbisulfit werden unter Bewegen zugegeben, bis der Bichromattest mit Diphenylcarbazid nicht mehr positiv ist. Das erhaltene Präparat wird auf 3 l gebracht und 1 Woche bei Raumtemperatur 35 aufgehoben. Zum Gerben werden 2 ccm dieser gealterten Chromoxydlösung je Gramm Kollagen auf 200 ccm verdünnt.

Ein 26 kg schwerer männlicher Bastard-Hund wird mit Pentobarital-Natrium lokal vom Becken bis zum Brustbeinknorpel betäubt. Der betäubte Teil wird von Haaren frei gemacht, gewaschen und mit Jodtinktur bestrichen. Die Bauchhöhle wird mit einem Median-schnitt freigelegt, der etwa 7,5 cm unter dem Brustbeinknorpel beginnt und 5 cm hinter dem Schambein 45 endet. Die untere Bauchschlagader wird freigelegt und beweglich gemacht, nachdem alle Nebengefäße im Operationsbereich abgebunden worden sind. Unterhalb der linken Nierenschlagader und über den Hüftschlagadern werden Gefäßklemmen angebracht und ein kleiner Teil der Schlagader zwischen den Klemmen herausgeschnitten. In die Hüftschlagadern jenseits der Klemmen wird Heparin eingespritzt.

Eine unverzweigte Fremdtransplantation von 3,7 cm Länge, die 7 Tage in einer Sterilisationslösung von 1 Gewichtsprozent Propylenoxyd in 50%igem Äthylalkohol gelegen und anschließend 28 Tage vor ihrer Verwendung darin aufbewahrt worden war, wird 15 Minuten mit steriler Kochsalzlösung gewaschen und dann zum Überbrücken des chirurgisch entfernten Teils der Schlagader verwendet. Die vorderen und hinteren Gefäßverbindungen werden durch fortlaufende, nach außer gekehrte Matratzen-nähte mit einfachen laufenden Stichen aus 5-0-Schlagader-Nähseide hergestellt. Darn werden die Klemmen entfernt und der Blutfluß wieder in Gang gebracht. Die operierte Stelle wird mit Bauchfell bedeckt, um ein Anwachsen mit dem Darm zu verhindern. Der Schnitt in der Bauchdecke wird mit unterbrochenen Nähten aus 2-0-Nähseide wieder ge-^{naht}

RECEIVED TIMENOV 20. " 6:22AM

FAXPAT INC

4

Dieser Hund wurde nach 90 Tagen getötet und eine Autopsie durchgeführt.

Allgemeiner Befund

Es wurden keine Zeichen großer Dilatation gefunden. Zwei Drittel der inneren Oberfläche der Transplantation war mit glattem, glitzerndem und von dem Endothelium des Versuchstieres nicht unterscheidbarem Pseudo-Endothelium bedeckt. Der mittlere Teil der Transplantation bestand aus einem unregelmäßigen rauen Teil.

Mikroskopischer Befund

Subakute entzündliche Reaktionen wurden an beiden Nahtlinien beobachtet. Diese waren teilweise durch die Seide hervorgerufen worden. Der größte Teil der Transplantation war vollständig mit neuem Fasergewebe infiltriert. Die Kollagenablagerung war nahe den Nahtlinien am größten. Elastisches Gewebe war nicht zu bemerken. Der als Pseudoendothelium beschriebene Teil bestand aus wohl differenziertem Bindegewebe, dessen Fasern in länglicher Richtung angeordnet waren. Der mittlere Teil der Transplantation bestand aus amorphem, durch Eosin leicht anfärbbarem Material ohne nukleare Elemente. Offensichtlich war dieser nicht störende wandständige Thrombus dabei, sich dem Organismus anzupassen.

Diese Befunde zeigen, daß die Transplantation völlig erfolgreich war, da sich innerhalb von 14 Tagen (der üblichen Zeit innerhalb welcher sich grober Mißfolg, d. h. Tod des Versuchstiers oder Paralyse des hinteren Teils einstellt) keine nachteiligen Folgen zeigten. Außerdem war die Transplantation auf dem Wege mit neuem Gewebe durchsetzt zu werden.

Beispiel 2

Das Vorfahren des Beispiels 1 wurde mit einem 30 kg wiegenden weiblichen Bastard-Hund wiederholt, wobei eine 3,3 cm lange Transplantation eingesetzt wurde, die nach der 7-tägigen Sterilisationszeit 14 Tage in der Sterilisationslösung aufbewahrt worden war.

Nach 268 Tagen ist der Hund lebendig und aktiv. Er hat fühlbare Pulse in den Oberschenkeln und zeigt keinerlei Symptome für ein Fehlschlagen der Transplantation.

Daraus ist ersichtlich, daß die Transplantation völlig gelungen ist.

Vergleichbare analoge Ergebnisse können durch bestimmte, beispielsweise durch die folgenden Abänderungen erzielt werden. Als Ausgangsmaterial wird ein röhrenförmiges Gefäß von einem Säugetier, vorzugsweise ein Blutgefäß von einem Rind, verwendet, einschließlich von solchen in Y-, T- oder sonst verzweigten Formen.

Die Enzymlösung kann handelsübliches Ficin oder ein gereinigtes und konzentriertes, das proteolytische Enzym enthaltendes Material sein. Die aktive Ficin-Konzentration in der Lösung soll etwa 0,25 bis 5%, vorzugsweise 0,5 bis 2,0% und insbesondere 0,5 bis 1,5%, betragen, wobei die höheren Konzentrationen einen schnelleren Abbau bewirken. Die Behandlungs-temperatur soll zwischen 30 und 45°C, vorzugsweise zwischen 34 und 40°C und insbesondere zwischen 36 und 38°C, liegen, wobei die höheren Temperaturen wieder schnelleren Abbau ergeben. Das Verhältnis von Gewichtsteilen: nasser Arterien zur Enzymlösung soll dabei innerhalb eines Bereiches von 1 bis 3 Teilen Arterie je 10 Teile Lösung, vorzugsweise zwischen 1 und 2:10, insbesondere bei 1,5:10, liegen. Die Behandlung soll auf PRINT TIMENOV 20. sc 6:26AM

1063330

5

4,0 und 7,0, vorzugsweise zwischen 4,5 und 6,0 und insbesondere zwischen 5,0 und 5,5, gepuffert sein, wobei in dem letzten pH-Bereich der schnellste Abbau erreicht wird. Die Abbauzeiten betragen 2 bis 8 Stunden, vorzugsweise 2,5 bis 6 und insbesondere 2,3 bis 5 3 Stunden. Konzentration, Menge, pH-Wert, Temperatur und Behandlungszeit werden so aufeinander abgestimmt, daß die gewünschte Erhöhung des festen Kollagengehalts erreicht wird.

Die Behandlung mit wäßrigem Formaldehyd wird 10 in einer Konzentration von 0,3 bis 3,3%, vorzugsweise von 0,3 bis 1,0% und insbesondere von 0,3 bis 0,5%, bei Temperaturen im Bereich von 10 bis 35°C, vorzugsweise 20 bis 35°C und insbesondere 25 bis 30°C, während einer Zeit von 4 bis 24 Stunden, vorzugsweise von 15 bis 20 Stunden und insbesondere von 17 bis 18 Stunden, durchgeführt. Atmosphären- oder erhöhter Druck kann verwendet werden.

Es können auch andere Härtungsmittel verwendet werden, die entsprechende Eigenschaften verleihen, z.B. Glyoxal, Chromoxyd oder wasserfreie Alkohole, wie Methanol, Äthanol od. a.

Die Sterilisation kann durch Behandlung mit einem Alkylenoxyd, wie Äthylen- oder Propylenoxyd, mit β-Propiolacton oder mit verdünntem wäßrigem Formaldehyd durchgeführt werden.

PATENTANSPRÜCHE:

1. Röhrenförmiges, in trockener Form oder in 30 einer sterilen Flüssigkeit aufzubewahrendes, bei 240 mm Quecksilbersäule Luftinnendruck un-durchlässiges, steriles, zum Einsetzen in Menschen oder Säugetiere geeignetes Kollagenmaterial, vor-

6

zugsweise in Y- oder T-Form, das einen Kollagengehalt von mindestens 80% aufweist und in dem die Kollagenfasern praktisch ihre natürliche Zusammensetzung aufweisen.

2. Verfahren zur Herstellung von röhrenförmigem Kollagenmaterial nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß röhrenförmige Blutgefäße von Säugetieren, vorzugsweise Rindern, mit einer 0,25- bis 5%igen Ficin-Enzymlösung bei Temperaturen von 30 bis 45°C in einem pH-Bereich der Lösung von 4,0 bis 7,0 während einer Zeit von 2 bis 8 Stunden bis zum Ansteigen des Kollagengehalts auf mindestens 80% abgebaut werden, worauf das behandelte Material zur Entfernung des Enzyms mit Wasser gewaschen und anschließend einer Härtungsbehandlung unterworfen wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Härtungsbehandlung mit wäßrigem Formaldehyd in einer Konzentration von 0,3 bis 3,3% bei Temperaturen zwischen 10 und 35°C während einer Zeit von 4 bis 24 Stunden durchgeführt wird.

4. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß als Härtungsmittel Chromoxyd verwendet wird.

5. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß als Härtungsmittel Methanol verwendet wird.

6. Verfahren nach Anspruch 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das gehärtete Material sterilisiert wird.

7. Verfahren nach Anspruch 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß mit Äthylen- oder Propylenoxyd sterilisiert wird.

BEST AVAILABLE COPY